

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. J. Uebelohne  
**Referent:** Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr  
**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. M. Markenschlager

Meinen lieben Eltern  
in Dankbarkeit

**Tag der Promotion:** 23. Februar 1990

**BIBLIOTHEK**  
▼ der Tierärztlichen Fakultät  
Königinstraße 10  
8000 München 22

DISSEMINATION UND PUBLIKATION FÜR DRUCK  
8000 München 2, Geschäftshaus am 15.7.92, Seite 2

**Inhaltsverzeichnis**

1.	<b>Einleitung</b>	
2.	<b>Schrifttum</b>	
2.1.	<b>Genomaufbau von Vaccinieviren</b>	2
2.2.	<b>Auftreten von Genomänderungen</b>	4
2.3.	<b>Lokalisation von Genomänderungen</b>	6
2.4.	<b>Genomänderung und Virulenz</b>	0
2.5.	<b>Vaccinievirus Ankara</b>	3
3.	<b>Material und Methoden</b>	5
3.1.	<b>Zellkulturen</b>	15
3.2.	<b>Virusstämme</b>	15
3.3.	<b>Marker rescue-Experimente</b>	16
3.4.	<b>Virusvermehrung</b>	17
3.4.1.	<b>Ausgangsmaterial</b>	17
3.4.2.	<b>Bestimmung des Wirtszellspektrums</b>	17
3.4.3.	<b>Virustritration</b>	18
3.5.	<b>Hemagglutination (HA)</b>	18
3.6.	<b>Verhalten im Brutei</b>	18
3.7.	<b>Verhalten in der weißen Maus</b>	19
3.8.	<b>Virureinigung</b>	19
3.9.	<b>Mehrteilige virale Proteine</b>	20
3.9.1.	<b>Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)</b>	20
3.9.2.	<b>Immunoblot (Western-blot)</b>	21

3.9.3.	Reaktion mit Monoklonalen Antikörpern (MAK)	21	2.2. Physikalische Kartierung des Vacciniaivirusstamms Ankara	42
3.10.	Untersuchung des Virusgenoms	22	3. Charakterisierung der während der Viruspassagierung auftretenden Veränderungen im Genom	48
3.10.1.	Isolierung viraler DNA	22	4. Marker rescue des Vacciniaivirus host-range-Gens	57
3.10.2.	Gel-elektrophorese	23	4.5. Darstellung viraler Proteine	58
3.10.3.	Bestimmung der Genomendfragmente	24	4.5.1. PAGE-Gel und Immunblot	58
3.10.4.	Größenbestimmung des Virusgenoms	24	4.5.2. Reaktion mit Monoklonalen Antikörpern	60
3.10.5.	Isolierung von DNA-Präparaten	24	4.6. Verhalten in der Zellkultur	61
3.11.	Nachweis viraler DNA	27	4.6.1. Cytopathischer Effekt (CPE)	61
3.11.1.	Southern Transfer	27	4.6.2. Wirtspektrum	62
3.11.2.	Markierung viraler DNA	28	4.7. Blaaggliutination	68
3.11.3.	Hybridisierung	29	4.8. Verhalten im Brutei	68
4.	Ergebnisse	32	4.9. Verhalten in der weißen Maus	69
4.1.	Veränderungen im Genom des Vaccinia-virusstamms Ankara im Verlauf der Passagierung	32	5. Diskussion	71
4.1.1.	Charakterisierung der DNA von Plaque-isolaten des Ausgangsstamms CVA 2	32	6. Zusammenfassung	81
4.1.2.	Charakterisierung der DNA verschiedener Passagen des Vacciniaivirusstamms Ankara mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	35	7. Summary	83
4.1.3.	Bestimmung der Genomgröße verschiedener Passagen des Vaccinia-virusstamms Ankara	37	8. Literaturverzeichnis	84
4.2.	Darstellung von Genomänderungen während der Passagierung	41		
4.2.1.	Identifizierung der Endfragmente	41		

-1-

#### **A. EINLEITUNG**

Durch den weltweiten Einsatz des Vacciniavirus (Orthopoxvirus *canis*) konnten im Jahre 1980 Pockenvirusinfektionen des Menschen für ausgerottet erklärt werden. Damit ist jedoch das Interesse am Impfvirus, dem Prototypen des Genus Orthopoxvirus, nicht erloschen. Seit kurzem ist dieses Virus durch seine Fähigkeit, fremde Gene aufzunehmen, zu exprimieren und gegen exprimierte Antigene eine Antikörperantwort im Organismus zu induzieren, wieder in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Aufgrund von Impfkomplikationen, die früher nach Krebsimmunisierungen bei diversen Vacciniavirus-stämmen beobachtet wurden, konzentrieren sich heute die Forschungen auf die Aufklärung der genetisch fixierten Virulenz. Ziel ist es, Virustämme zu finden, die frei von Nebenwirkungen und somit geeignet für die Konstruktion von "sicheren" Vaccinia-Rekombinanten sind.

Der in über 570 Passagen auf Rühnerembryotibzellenzellkulturen attenuierte Stamm KVA unterscheidet sich in einer ganzen Reihe von Eigenschaften, insbesondere einer stark reduzierten Virulenz, von anderen Vacciniavirusstämmen. Es bietet sich an, dieses Virus aufgrund der genauen Kenntnis seiner biologischen Merkmale als Modell für Untersuchungen zur Virulenz heranzuziehen.

Vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, die während der Passagerzeit aufgetretenen Veränderungen im Virusgenom aufzusezigen und diese charakteristischen phänotypischen Eigenschaften zuzuordnen.

## 2. SCHRIKTTEN

### 2.1. Genomauflösungen von Vacciniaviren

Das Genom von Vacciniaviren besteht wie bei allen Pockenviren aus einem linearen, doppelsträngigen DNA-Molekül. Das mittlere Molekulargewicht wird mit 123 Megadalton (MD) angegeben, das entspricht ungefähr 186.000 Basenpaaren (bp) (Moss, 1985).

Bezüglich der genauen Genomgröße variieren die Literaturangaben jedoch stark. Die Längenmessung des DNA-Moleküls im Elektronenmikroskop und Untersuchungen über das Sedimentationsverhalten der Virus-DNA in Viskositätsgradienten waren lange die zuverlässigsten Methoden zur Ermittlung des Molekulargewichts (Geshelein und Berns, 1974; Gafford et al., 1978). In jüngerer Zeit erfolgt die Größenbestimmung des Vaccinia-Genom nach Verlust der DNA mit Restriktionsenzymen; dabei werden die Molekulargewichte der einzelnen Restriktionsfragmente nach Gelelektrophoretischer Trennung durch Vergleich mit Molekulargewichts-Standards bestimmt und summiert (Gangemi und Sharp, 1976; Müller et al., 1977). Da die Trennfähigkeit der Agarosegele mit zunehmender Molekülgröße jedoch stark abnimmt (Gangemi und Sharp, 1976; McCarron et al., 1978), bereitet die Größenabschätzung von DNA-Fragmenten im Bereich von über 25 Kilobasenpaaren (Kbp) Schwierigkeiten (Mackett und Archard, 1979). So schwanken z.B. die Molekulargewichtsangaben des größten HindIII-Fragments des Vaccinia-Genomstammes Western Reserve (VV-WR) je nach Arbeitsgruppe zwischen 30 MD (~ 45 Kbp) und 37 MD (~ 36 Kbp), die Gesamtgenomlänge von 119 MD (~ 180 Kbp) bis 132 MD (~ 159 Kbp) (Gangemi und Sharp, 1976; McCarron et al., 1978; Mackett und Archard, 1979; Panicali et al., 1981; Dafilippi, 1982).

Eine Besonderheit des Vaccinia-Genoms ist die kovalente Bindung der beiden DNA-Strände am Genomende. Unter Denaturierungsbedingungen bleiben die Einzelstrände – oder nach Restriktionsenzymverarbeitung die terminalen Fragmente – noch miteinander verbunden (Geshelein und Berns, 1974) und können rasch wieder renaturieren ('snap back'-Mechanismus). Dies macht man sich zur Identifizierung der Genomenden nach Restriktionsenzymverlust zu nutz (Dafilippi, 1976; Witter et al., 1977; Jaureguiberry, 1977; Mackett und Archard 1979).

Dabei renaturieren nur Endfragmente wieder zu doppelsträngigen DNA-Molekülen und können nach Elektrophorese im Vergleich mit dem Pragmentmuster der Gesamt-DNA identifiziert werden. Die übrige, denaturierte, einzelsträngige DNA wird im Gel nicht als Bande sichtbar. Die kovalente Bindung der Genomenden ist dabei nicht spezifisch für Vaccinia-DNA. Ähnliche DNA-Strukturen werden im Genom des Virus der Afrikanischen Schweinepest (Genus Yıldoviridae) vermutet (Ortin et al., 1979) und sind bei Adenoviren und Poxviren die Basis für bestehende Replikationsmodelle (Moss, 1985).

Eine weitere Besonderheit der Orthopocken-DNA sind die 'Inverted Terminal Repeat' (ITR) Regionen im Bereich der Genomenden. Dabei wiederholen sich Basensequenzen vom linken Terminalus am rechten Genomende, jedoch umgekehrt komplementär zueinander (Wittke et al., 1977; Wittke et al., 1978a). Besonders gut untersucht ist der ITR-Bereich des VV-WR mit einer Größe von 10.500 Basenpaaren (Garon et al., 1978). In dieser Region fanden Wittke und Moss (1980) nahe am Genomende zwei Blöcke von Sequenzwiederholungen, bei denen es 13 bzw. 17 mal hintereinander zu einer Wiederholung von 70 Basenpaaren kommt. Die Untersuchung verschiedener Virusplaque des VV-WR zeigte eine große Variation in Anzahl und Größe der 70 bp Sequenzwiederholungen (Baroudy und Moss, 1982). ITR-Regionen kommen offenbar in den Genomen aller Orthopockenviren mit Ausnahme von Variolavirusstämme vor. Die zugrunde liegenden Sequenzen sind ähnlich, so daß es nicht nur innerhalb des Genoms, sondern speziesübergreifend zu Kreuzhybridisierungen kommt (Mackett und Archard, 1979).

Die ersten 104 Nukleotide an beiden Genomenden bilden auf Grund ihrer inkompletten Basenpaarung eine inverse komplementäre Saarmadelstruktur, die sogenannten 'clip-flip-terminal-loops'. Auf der Existenz dieser Saarmadelstruktur beruhen die zur Zeit gültigen Replikationsmodelle für Vacciniavirus-DNA (Baroudy et al., 1982, 1983):

zinselstrangbrüche in der DNA der ITR-Region können unter Aufleitung der 'terminal-loops' das Virusgenom in lineare DNA-Einzelstränge teilen und freie 3'-OH-Enden als Starter für die virale DNA-Polymerase liefern ('self-priming'). Die Fortsetzung der Replikation stellt man sich vor durch ein Anländerelagern von ITR-Sequenzen (Wittke und Moss, 1980; Baroudy et al., 1982), die zum Auftreten der während der Replikation beobachteten Übergangskonkatenen der Virus-DNA

-4-

Führten (Moyer und Graves, 1981). Merchlincky et al. (1988) konnten klonierte Replikationskonkatenen der Vaccinia-DNA als Doppelkopies der terminalen Haarnadelstrukturen identifizieren. Gleichzeitig lokalisierten sie an deren Rändern Schnittstellen einer Vaccinia-Ruklese, die Einzelstrang-Schleifen herbeiführen und wieder schließen kann.

Die Untersuchung des Genoms verschiedener Orthopockenspezies mit Restriktionsendonukleasen ergab zahlreiche konstant wandelnde Fragmente, die alle dem mittleren Teil des Genoms zuzuordnen sind. Besonders das Restriktionsensystem HindIII erwies sich als geeignet zur physikalischen Kartierung (MacCaffett und Archard, 1979; Phillipps, 1982; Esposito und Knight, 1985). Die Ganharten zeigen im inneren Genombereich eine sehr einheitliche Verteilung der Enzymschnittstellen. Etwa zwei Drittel des Gesamtgenoms sind bei allen Orthopockenspezies hochgradig konserviert. Variationen treten in der Länge und in Aufbau der terminalen Fragmente auf. Dabei können die Genomlängen beträchtlich schwanken. Esposito und Knight (1985) berechneten die Genomgrößen von Kuhpockenvirusstämmen mit mehr als 220 kbp, von Variolavirusstämmen dagegen mit 180 kbp. Selbst innerhalb einer Orthopockenvirusspezies können einzelne Isolate auf Grund des Aufbaus ihrer terminalen Fragmente unterschieden werden.

## 2.2. Änderungen von Genomstrukturen

Längenvariationen im Genom von Orthopockenviren und Ihre Lokalisation im terminalen Genombereich werden vor allem mit dem Mechanismus der DNA-Replikation und dem besonderen Aufbau der Genomenden in Verbindung gebracht. So ergab die Untersuchung einer phänotypisch einheitlichen Vaccinia-viruspopulation eine Ver-schiedenartigkeit der entsprechenden DNA-Fragmente, die sich in Auftreten von unscharfen oder submolekularen Banden im Agarosegel darstellte und durch Klonieren der Viruspopulation erhalten werden konnte (Wittke et al., 1978b). In diesem Zusammenhang beschrieben Moss et al. (1981a) eine sehr variable, instabile Vervielfältigung kurzer "random repeat"-Sequenzen in der ITR-Region des Genoms aufzüllig gepickter Virusplaque. McFadden und Dales (1979) berichteten im Rahmen der Untersuchung temperaturempfindlicher Vaccinivirusmutanten von spleißbilden Mikrodeletionen am Genomende bei 20 % aller Virusklone.

-5-

In Verschlehrungsmodellen für Vaccinieviren (Baroudy et al., 1982; 1983; Wittke und Moss, 1980) spielen die ITR-Regionen des Virusgenoms eine wichtige Initiatorrolle bei der DNA-Replikation. Das Aneinanderlagern der ITR-Sequenzen im Replikationskomplex dient als Ausgangspunkt für die Synthese eines DNA-Tochterstrangs. Erfolgt diese Aneinanderlagerung ungleichmäßig, sind Verschiebungen und Duplications der repetitiven Sequenzen denkbar, die die Variabilität der Genosseenden verursachen. Dabei ist die Erhaltung einer symmetrischen Genomstruktur als grundlegendes Prinzip anzusehen (Wittke, 1982). So sind Virusmutanten bei Kaninchenpockenviren, bei Affenpockenviren und bei Kuhpockenviren bekannt, bei denen Abschnitte des einen Genomendes durch Duplikate der Sequenzen des gegenüberliegenden Genomendes ersetzt werden (Moyer et al., 1980; Esposito et al., 1981; Pickup et al., 1984). Bei entsprechenden Translokationen kann die Genomgröße der Mutanten um bis zu 30 kbp anwachsen, obwohl in Wirklichkeit Sequenzen verloren gegangen sind. Genomänderungen können über auch im konstanten Genombereich vor und können mit dem Verlust einzelner Nukleotide oder aber der Deletion ganzer Sequenzabschnitte einhergehen. Punktmutationen im Genom treten meist als Folge der Anpassung an plötzlich eintretende Selektionsbedingungen, wie den Einsatz antiviraler Wirkstoffe oder die selektive Erhöhung der Umgebungstemperatur auf (Tartaglia und Paletti, 1985; Brillien und Spehner, 1993). Dagegen konnten nach Dauerpassagen in Zellkulturen Virusmutanten isoliert werden, die beträchtliche Deletionen in ihrem Genom aufwiesen. Zwei solcher Mutanten des VV WR hatten in der linken Genomhälfte gleich im Anschluß an die ITR-Region ein über 10 kbp großes DNA-Stück verloren (Moss et al., 1981b; Panicali et al., 1981). Obwohl die Sequenzen nachweislich für mehrere Proteine kodierten, waren bezüglich des Nachatums in der Zellkultur keine Unterschiede zu den Wildtypviren zu erkennen. Ein anderer Weg zur Entstehung neuer Genotypen bei Orthopockenviren ist schon lange bekannt, die Rekombination (Woodroffe und Penner, 1960). Bei der gleichzeitigen Infektion einer Zellkultur mit verschiedenen Virusstämmen kommt es während der Replikation in der Wirtszelle durch das "molekulare Kreuzen" aneinandergelegter DNA-Stränge zum Austausch von Genmaterial. Die Überreplikation und weiterer Genombereiche der Orthopockenviren hat zur Folge, daß nicht

6-

nur Rekombinanten einer Virusartes gebildet werden, sondern begünstigt auch die Entstehung von Rekombinanten zwischen verschiedenen Spezies von Orthopockenviren. Hybride hergestellt aus Kuhpockenviren und Variolaviren wiesen die biologischen Eigenschaften von Kuhpockenviren und die von Variolaviren auf (Bedson und Dumbell, 1964b). Insgesamt liegen sich bei diesen Experimenten 10 phänotypisch verschiedene Rekombinante isolieren. Bedson und Dumbell (1964a) beschrieben auch die unerwartet wechselnde Pathogenität solcher Speziesvarianten für verschiedene Viren. Sie rekombinierten Kaninchenpockenviren (pathogen für Kaninchen und Mäuse) und Alastraviren (pathogen für Kaninchen und Mäuse) zu Hybriden, die teils nur pathogen für Kaninchen, teils nur pathogen für Mäuse waren. Die biologische und genetische Charakterisierung von Rekombinanten zwischen Vacciniaviren und Mäusepockenviren zeigte, daß sich die pathogenen Eigenschaften verschiedener Virusarten auch summieren können (Chernas et al., 1985). Das natürliche Auftreten neuer Pockenvirusisolale mit bisher unbekanntem Phänotyp könnte auf die genetische Rekombination urprünglicher Virusarten zurückzuführen sein. Vielleicht liegt hierin sogar die Lösung der Frage nach der Herkunft des Vaccinivirus (Gershon et al., 1989).

### 2.3. Lokalisation von Genomdeletiomen

Einblicke in Aufbau und Funktion eines Virusgenoms sind erst möglich, wenn sich Änderungen des Erbmaterials auf die phänotypischen Eigenschaften auswirken.

Als besonders geeignet erwies sich die Untersuchung von Virusmutanten, denen - sei es durch Punktmutationen oder durch Deletionen bewirkt - ein bestimmtes, identifizierbares Merkmal fehlt. So isolierten Gessell und Fenner (1960) Kaninchenpockenvirusmutanten mit atypischen Mischstam auf der Chorioallantoismembran. In anderen Laboratorien wurden durch direkte Mutagenese temperaturempfindliche, wirtszellabhängige oder wirkstoffresistente Vacciniairusmutanten selektiert (Fenner und Bamforth, 1966; Sambrook et al., 1966; Subak-Sharpe et al., 1969; Dubbs und Kit, 1964).

Die Analyse dieser Mutanten in aufwendigen Rekombinantenversuchen und erste Genomuntersuchungen mit Restriktions-

7-

ausbildung verantwortlichen Gehorte geben (Moyer und Rothe, 1960; Drillien et al., 1982).

Die Entwicklung der marker rescue-Technik (Hutchison und Edgell, 1971), also das gesteckte Zurückgewinnen eines genetisch verankerten Merkmals, brachte die Möglichkeit, Gene im Virusgenom genau zu lokalisieren. Im Zellkulturraster wird zur infektiösen DNA einer Virusmutante mit Merkmalsverlust das mit Restriktionsenzymen geschnittene Genom des Wildtypvirus suggegeben. Während der Virusreplikation rekombinieren in der Zelle Teile der DNA des Mutantengenoms mit komplementären transfizierten Wildtypvirus-Fragmenten. Werden dabei die Deletionen der Mutante durch die angelegerten DsB-Fragmente überbrückt, erhält die entstehende Virusrekoombinante den verlorenen, phänotypischen Marker wieder zurück. Durch den wechselseitigen Einsatz verschiedener DsB-Fragmente in den Experimenten wird überprüft, welches Fragment die Ausgangseigenschaft wieder herstellt. Dieses Fragment wird dann mit Hilfe anderer Restriktionsenzyme noch weiter subkliert, um mit den erhaltenen Unterfragmenten die marker rescue-Experimente zu wiederholen. Auf diese Weise kann die Größe der Deletion im Genom der Virusmutante sehr genau bestimmt werden. Ist der für die Merkmalsausbildung kodierende Genbereich bestmöglich eingeengt, erfolgt im Anschluß die Analyse der Gensequenz. Aus der Identifizierung transkribierter Sequenzenstelle und der Entschlüsselung der sich daraus ergebenden Aminosäurenhänfelnfolge können im Vergleich mit bereits registrierten Gensequenzen Herologien festgestellt und erste Struktur-Wirkungs-Besitzungen der Genprodukte abgeleitet werden.

Die marker rescue-Technik wurde schon bald zur Lokalisation von Mutationen bei Adeno- und Herpesviren erfolgreich eingesetzt (Arrand, 1978; Frost und Williams, 1978; Bookburt et al., 1978; Knipe et al., 1978). Bei Pockenviren dagegen verhinderte die fehlende Infektiosität der isolierten Virus-DsB zunächst eine Anwendung dieser Methode (Sas und Dumbell, 1981). Die entscheidende Modifikation war, die zum 'rescue' erforderlichen DsB-Fragmente durch Transfektion im Überschuß in infizierte Zellen einzuschleusen. Nur die Verwendung eines geeigneten Suchsystems (screening) erlaubt die Isolation der gewünschten Virusrekoombinanten. Erste erfolgreiche marker rescue-Experimente bei Vaccinieviren führten Sam und Dumbell (1981) zur Charakterisierung

temperaturempfindlicher Virusmutanten und Nakano et al. (1982) zur Methodik der DNS-Transfektion an Deletions-mutanten durch. Diese neue Technik beschleunigte den Fortschritt der Genkartierung bei Vaccinia-viren beträchtlich. Mittlerweile konnte eine ganze Palette verschiedener temperatursensitiver Vaccinia-virusmutanten genetisch charakterisiert werden (Condit et al., 1983; Drillien und Spchner, 1983). Dabei fiel auf, daß die verantwortlichen Gendefekte über die gesamte Zentralegion des Gens aus vertraut auftraten, nicht aber an den Genenden. Daher wird angenommen, daß die Mehrheit der Gene, die zur Virusvermehrung unter *in-vitro* Bedingungen essentielle Enzyme und Regulatorproteine kodieren, in der hoch konservierten zentralen Region des Vaccinia-virusgenoms liegen.

Das Enzym Thymidinkinase (TK) ist das erste Vaccinia-virusprotein, dessen Gen im Virusgenom mit Hilfe von marker rescue genau lokalisiert werden konnte (Meir et al., 1982). TK-negative Virusmutanten konnte durch Transfektion mit Wildtypvirus DNS-Fragmenten der TK-positive Phänotyp wieder-gegeben werden. Ein Plaque-test auf TK-negative Zellen diente zur Selektion. Das einfache Selektionsystem machte diesen im HindIII J-Fragment gelegenen Genlokalus zur bevorzugten Insertionsstelle für Fremdgene.

Jones und Moss (1984) beschrieben die Kartierung des Gens der Vaccinia DNS-Polymerase. Sie verwendeten dazu eine Mutante, die gegen den DNS-Polymeraseinhibitor Phosphono-acetat (PAA) resistent ist. In Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, daß nur ein in der linken Genomhälfte liegendes HindIII-Fragment (Z) der resistenten Virusmutante mit der DNS eines PAA-sensitiven Wildtypvirus zur Bildung des PAA-resistenten Phänotyp reakomprimiert.

Tartaglia und Paolotti (1985) fanden im HindIII D-Fragment des Vaccinia-virusgenoms den Genort für die Resistenz gegen den antiviralen Hemmstoff Rifampicin. Dieser Wirkstoff verhindert den Zusammenbau bereits fertig vor synthetisierter Proteine zu reifen, infektiösen Partikeln. Die Sequenzanalyse der DAB von Rifampicin-resistenten Virusmutanten und nicht resistenten Vaccinia-virus Wildtypen zeigte, daß lediglich eine Punktmutation im Kodierungsbereich für ein 62 KD Polypeptid zur Resistenzausbildung ausreicht (Tartaglia et al., 1986; Baldick und Moss, 1987).

Marker rescue-Experimente von Villarreal und Hruby (1986) lokализierten das Gen für eine andere Wirkstoffresistenz, die Resistenz gegen  $\alpha$ -Amantin im HindIII H-Fragment. Die Untersuchung der verantwortlichen Gensequenz soll neue Einblicke in die Funktion idölicher Virusproteine bei Transkriptionsvorgängen im Zellkern der Wirtszelle ermöglichen (Tamin et al., 1988).

Shida (1986) erforschte die Struktur des Vaccinia-Hemagglutinin (HA) und dessen Genort. Der kodierende Bereich wurde in Transfektionsversuchen mit HA-negativen Mutanten des Vaccinia-virusstamms 1MD-J am Koperaten rechten Ende des HindIII A-Fragments kartiert. Dabei diente die Rotfärbung HA-positiver Virusplaques durch Hühnererythrozyten als Selektionsystem. Flechner et al. (1987) erreichten durch die gezielte Deletion des Hemagglutinin-Gens eine wirkliche Attenuierung bei Vaccinia-viren. Da das Hemagglutinin-Gen für die Virusreplikation nicht essentiell ist und Rekombinantenvi-rusattenuierung nicht möglich ist, ist der Genort als Insertionsstelle für Fremd-DNA gut geeignet. Parkus et al. (1986) verwendeten die marker rescue-Technik zur Konstruktion von Insertionsmutanten bei Vaccinia-viren. Durch das Einsetzen des Thymidinkinasegenes des Herpes Simplex Virus in das Vaccinia-virusgenom gelang es, eine Reihe von Genorten zu charakterisieren, an denen inserierte Fremd-DNA exprimiert wird, ohne die Vermehrungsfähigkeit der Trägerviren zu beeinträchtigen.

Pax et al. (1985) isolierten Varianten des Vaccinia-virusstamms Western Reserve mit charakteristischen, kleinen Plaques. Für den "kleinen" Plaquephänotyp war die Strukturänderung im Gen eines 16 kD Hülleprotein aus dem HindIII A-Fragment verantwortlich (Dallo et al., 1987). Rodrigues und Esteboan (1989) empfehlen den Plaquephänotyp als Selektionsmarker für die Konstruktion von Vaccinia-virusmutanten. Kuhpockenviren (KPV) produzieren auf skarifizierten Hautarealen von Kaninchen und auf der Chorioallantoismembran infizierter Hühnereler auffallend hämorrhagische Pocken-illisionen; sogenannten "weißen" Virusmutanten fehlt diese phänotypische Eigenschaft. Pickup et al. (1984) fanden im Genom solcher Mutanten große Deletionen am rechten Genende. In marker rescue-Experimenten konnte im KpnI D-Fragment des KPV-Genoms das zugehörige Gen lokalisiert werden.

Es kodiert für die Aminosäuresequenz eines 38 kD Proteins, das große Ähnlichkeit mit Plasmarezeptoren aufweist, die als Inhibitoren verschiedener Serin-Proteasen in die Regulation der Blutgerinnung eingreifen. Vermutlich besitzt das virale Protein eine ähnliche biologische Aktivität und ruft so die "Hämorragie der Pockenläsionen" hervor (Pickup et al., 1986).

In infizierten Zellen induzieren Kuhpockenviren große syncytiale Einschluskkörperchen vom Typ A, deren Auftreten allgemein als morphologisches Merkmal zur Differenzierung zwischen Kuhpockenviren und Vaccinia- bzw. Variolaviren genutzt wird (Ichihashi et al., 1971). Die Typ A Einschluskkörper bestehen aus einem im Überschuß produzierten, viralen "late" 160 kD Polypeptid (Shida et al., 1977a,b). Vaccinia-viren produzieren anstatt des 160 kD Proteins ein antigenisch nahe verwandtes 94 kD Polypeptid, bilden aber keine Typ A Einschluskkörperchen (Patel et al., 1986). Durch Transfektion von KPV-DNA in das Genom von Vaccinieviren gelang es Punahashi et al. (1988) das Gen des 160 kD Proteins in KHDIII A-Fragment des KPV-Genoms zu finden. In Hybriddisziplinsexperimenten wurde im KHDIII A-Fragment des Vaccinia-Genoms eine vergleichbare komplettante Centrstruktur lokalisiert. In Expressionsexperimenten (cat assay) mit der Promotor-prototoren eine starke Erhöhung der Aktivität erreicht werden. Diese Ergebnisse machen den Genlokus als Insertionsstelle für Fremdgene interessant, wenngleich Struktur und Funktion des eigentlichen Vaccinia-Gens noch genauer zu untersuchen sind.

#### 2.4. Genomänderung und Virulent

Im Hinblick auf eine erneute Anwendung als Impfivirus hat die Untersuchung der genetischen Grundlagen von Virulenz-eigenschaften für Vaccinieviren große Bedeutung. Die Fähigkeit zur Bildung von Thymidinkinase (TK<sup>-</sup>) spielt für die Ausprägung der Virulenz bei Vaccinieviren eine besondere Rolle. Buller et al. (1985) berichteten, daß Vaccinivirus-Vektorrekonbinanten mit einem TK-negative Phänotyp für Mäuse nach intraperitonealer und intrazerebraler Verabreichung deutlich weniger virulent waren als die TK-positiven Vaccinivirus Wildtypen. Für den Virulenzverlust war eindeutig der TK-negative Phänotyp, nicht aber

die am TK-Lokus inserierte Prend-DNA verantwortlich. Andere Impfexperimente mit TK-negative Vaccinivirusrekonbinanten an Kaninchen und Schimpansen bestätigten diese Ergebnisse (Buller und Moss, 1985).

Durch Deuerpassagen in persistent infizierten Friend-Erythroleukämiezellen (FRL) zellen konnten verschiedene Vaccinia-virus Deletionsmutanten isoliert werden, die sich durch kleine Plaques auszeichneten. Neben einer 8 MD großen Deletion am linken Genomende (Pao et al., 1985) konnte durch starker rescue-Versuche nachgewiesen werden, daß der Phänotyp, unabhängig von der großen Deletion am linken Genomende, auf den Verlust eines Gens im KHDIII A-Fragment, also im hoch konservierten Genombereich zurückzuführen ist. Das Gen kodiert für ein 14 kD Vaccinivirus Hüllprotein, das eine wichtige Rolle bei der Viruspenetration in die Wirtszelle zu spielen scheint (Dallo et al., 1987; Rodrigues und Esteban, 1987). In Infektionsversuchen an Mäusen verdeutlichten Dallo und Esteban (1987), daß beide Genomänderungen eine Attenuierung des Wildtypvirus verursachen. Allerdings bedingt die 8 MD Deletion im linken Genomarealus einen größeren Virulenzverlust als die Deletion des Hüllproteins (Rodrigues et al., 1989).

Moss et al. (1981b) isolierten eine Vaccinivirusmutante (5/2) mit einer großen Deletion in der linken Genomhälfte, im Bereich der KHDIII Fragmente C/M. Transkriptions-Experimente zeigten, daß die Mutante eine ganze Gruppe von RNA-Molekülen nicht mehr synthetisieren kann. Obwohl die fehlenden Gene für die Virusverarbeitung in Zellkulturen nicht erforderlich sind - es traten keine Mischzüchtungen unterschiedliche Virusmutante und Wildtypvirus auf - ergeben vergleichende Tierstadien eine deutliche Attenuierung der Deletionsmutante 5/2 (Buller et al. 1985). Genaue Sequenzuntersuchungen bestätigten, daß ein Teil dieser nicht essentiellen Gene für sekretorische Virusproteine, sogenannte Virotine, kodiert (Kotwali und Moss, 1988a,b). Eines der identifizierten Proteine, ein 35 kD Polypeptid, hat große Ähnlichkeit mit einem humanen Protein, das das Komplement 4b bindet. Das Virotine hemmt in gereinigter Form die klassische Komplementkaskade und könnte daher das Abwehrmechanismus des Wirtszwanzes entgegenwirken. Auch das Fehlen eines weiteren sekretorischen, 12 kD Vaccinivirusproteins, dessen Funktion noch nicht bekannt ist, ist an der veränderten Virulenz der

Virumante 6/2 beteiligt (Kotwal und Rose 1988b, Kotwal et al., 1989). Vacciniviren besitzen in beiden ITR-Regionen ihres Genoms ein Gen, das für ein weiteres sekretorisches Virusprotein, den Nachstumsfaktor VGF (Vaccinia Growth Factor), kodiert (Fowardsik et al., 1985). Dieses 19 kD Polypeptid kann an den IGF (Epidermal Growth Factor)-Rezeptor von nicht infizierten Zellen binden und deren Nachstum stimulieren. Buller et al. (1988a, b) konnten durch beidseitige Deletion des VGF-Gens eine virusinduzierte Zellproliferation verhindern und die Virulenz in der Maus und im Kaninchen abschärfen. Dagegen waren in der Verzweigungsfähigkeit in Zellkulturen zwischen den konstruierten Deletionselementen und dem Wildtypvirus keine Unterschiede festzustellen.

Eine andere Vacciniviruvariente wurde nach direkter Mutation mit salpetriger Stärke anhand ihrer Plaquemorphologie selektiert (Drillien et al., 1981). Das Wirtszellspektrum (host range) der Virusvariante war stark eingeschränkt. Sie konnte auf den meisten humanen Zelllinien nicht, auf Affenzelllinien nur schwach vermehrt werden. Im Nachstum auf HEV-Zellen, auf einer Hamsterzelllinie und auf zwei Mäusezelllinien unterschieden sich die host range-Mutante und das Wildtypvirus nicht. Die Restriktionsenzymanalyse der DNA zeigte, daß von der linken Seite des Genoms ein ca. 18 kbp großer DNA-Abschnitt einschließlich eines Teils der ITR-Region deletiert war. Der für das Wirtszpektrum verantwortliche Genbereich wurde in weiteren rescue-Experimenten mit der Deletion überpappenden Wildtypvirus DNA-Fragmenten immer mehr eingesengt. Schließlich gelang es, am Übergang der HindIII-Fragmente K und X des Virangenoms eine kurze DNA-Sequenz zu lokalisieren, die ausreichte, der host range-Mutante die Vermehrungsfähigkeit auf der humanen Zelllinie HEV 2 wiederzugeben (Gillard et al., 1985). Die Ergebnisse von Sequenzierung und in-vitro Translation des Genombereichs belegen eine Geneexpression. Das host range Gen kodiert für ein 29 kD 'early' Polypeptid, das zur Aufrechterhaltung der Proteinsynthese in infizierten Zellen beitragen oder aber einer antiviralen Aktivität bestimter Zellen entgegenwirken könnte. Auf Grund seiner Lage im Vaccinogenom könnte das host range-Gen ein weiteres Beispiel für Vaccinogenen sein, die in direkter Beziehung zu Wirtsgenen in Regulationenmechanismen des Wirtszystems eingreifen. Auf dieser Basis

13-

Wird ein Zusammenhang zwischen Wirtszellspektrum und Virusvirulenz vermutet (Gillard et al., 1986).

#### 2.5. Vacciniviruse Ankara

Der Dermovaccinivirus Ankara (CVA) kam in den 50er Jahren in der Bundesrepublik als Pockenschutzimpfstoff in den Verkehr und wurde in über 500 Passagen auf embryonalen HBHnerfibroblasten (HEF)-Zellkulturen attenuiert. Ab der 516. Passage auf HEF-Zellen erhielt der Virusstamm den Namen Modifiziertes Vaccinivirus Ankara (MVA) (Mayr et al., 1975).

Das MVA-Virus läßt sich durch seine stabilen biologischen Marker von anderen Spezies der Orthopockenviren sicher differenzieren. Besonders deutlich ist seine verminderte Virulenz für den Hühnerembryo, für Versuchstiere und für den Menschen. Getestet an einer großen Anzahl von Nagern und Affen konnte - im Gegensatz zu anderen Vacciniviren - bei supprimierten Tieren keine Verstärkung der Virulenz beobachtet werden (Mayr et al., 1978). Die Eignung des MVA-Virus für die Pockenimpfung des Menschen erwies sich bei der komplikationslosen Kreuzimpfung von über 120.000 Personen (Stichl et al., 1974; Mayr und Danner, 1979).

Im Gegensatz zum Ausgangsvirus CVA besitzt der Virusstamm MVA ein sehr eingeschränktes Wirtszpektrum in Zellkulturen. Die nur mehr abortive Vermehrung des MVA-Virus in menschlichen Zellkulturen wurde zur Einschätzung der Unsicherlichkeit des Virus für Kreiselpflinge herangezogen (Mayr et al., 1978). Altenburger et al. (1989) verglichen in Untersuchungen mit Restriktionsenzymen die Genome der Vaccinivirusestämme MVA und MR. Sie fanden im Genom des Virusstammes MVA, neben der Verkleinerung der HindIII-Fragmente B und C, im Bereich der Fragmente M/M eine Deletion von 2,5 kbp, die den Verlust einer HindIII-Schnittstelle bewirkte. Der Sequenzvergleich dieses Genbereichs bei den Vacciniviren MVA und MR ergab Polypeptide mit noch unbekannter Funktion. Gleichzeitig sind mehr als zwei Drittel des host range-Gens verlorengegangen. Während Gillard et al. (1986) das Genprodukt als ein 29 kD Polypeptid bestimmten, errechneten Altenburger et al. (1989) ein 32 kD Protein. Des Weiteren konnten im Genom von MVA noch vier andere, allerdings sehr kleine Deletionsen (1, 14, 16

-14-

und 17 bp) und mehrere Mukotoïd-Transitions festgestellt werden. Die kleine 14 bp Deletion liegt in der Promotorregion des host range-Gens. Aufställigerweise konnte sich der Virusstamm MVA auf der humanen Zelllinie 143 BTK noch vermehren, während diese Zelllinie für eine Virusmutante, der der komplette host range-Bereich fehlt, nicht mehr permissiv war (Drillien et al., 1981).

Der direkte Vergleich der Virusstämme CVX und MVA soll die in der Passageserie aufgetretenen Änderungen im Genom von zwei phänotypisch so verschiedenen, aber eng verwandten Virusstämmen aufzeigen. Insbesondere interessiert, ob die Veränderung im host range-Bereich als alleinige Ursache einer reduzierten Virulenz anzusehen ist, oder ob andere Veränderungen ebenfalls eine Rolle spielen.

-15-

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Zellkulturen

Zur Virusverehrung bzw. zur Ermittlung des Wirtszellspektrums wurden die in der Tabelle 1 aufgeführten Zellkulturen und Zelllinien verwendet und nach Standardmethoden kultiviert (Mayr et al., 1974). Als Kulturmilieudien Minimus Essential Medium mit Zusatz von Earle's Salzen (EZEM), Medium TC 159 oder RPMI 1640 Medium, deren entweder fetales Kalberserum (FBS) oder Bovin Medium Supplement (BMS) zugesetzt wurde (alle Medien und Zusätze stammten von der Fa. Biochrom, Berlin).

Primär embryonale Hühnerfibroblastenzellkulturen (HEP) und bovine embryonale Lungenzellkulturen (BLZ) wurden aus 10 Tage befrüchten Hühnerküken (Gut Heinrichsruh, Langenbach) bzw. 3-4 Monate alten Rinderfeten (Schlachthof München) nach dem von Mayr et al. (1974) beschriebenen Verfahren der fraktionierten Trypsinierung hergestellt.

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Zellkulturen

		Beschreibung und Herkunft	Passage (P)
HEP		Hühnerembryofibroblasten	prim./sek.
BEL		Bovine embryonale Lungen	prim./sek.
MA 104		Affenzellen	34.
VERO		Affenzellen	132.
E-DRM		Equine Dermazellen	28.
KDRK		Bovine Kierezellen	114.
MOCK		Canine Mierezellen	217.
RK 13		Kaninchenzellen	96.
DRF		Mauszwerzerzellen	6.
LSCC-H-32		Hühnerfibroblastenzelllinie	132.
MTLA		Humanes Epithelkarzinom	13.
HEL		Humanes embryonale Lungen	13.
MRT 18		Humanes Rektalumorzellen	30.
HEP 2		Humanes Epitheloidkarzinom	6.

### 2.2. Virusstämme

Vom Vacciniaivirus Akata (Börrlich und Mayr, 1957; Mayr et al., 1975) konnten die 2., die 382. und die 574. Passage auf embryonalen Hühnerfibroblasten (HEP) bzw. die 486. Passage auf embryonalen Schweinezellen (EBS) untersucht werden.

Als Vergleich diente der WHO-Vacciniaivirus-Referenzstamm Elstree (Listerinstitut).

zu Beginn der Untersuchungen wurden alle Virusstämme dreimal auf HEV-Sekundärkulturen bzw. auf der Zelllinie MA 104 (Electro) nach der Plaqueassimethode kloniert (Mayer et al., 1974). Im folgenden werden die plaquegereinigte 2. HEV-Passage des Vaccinia-Stamms Ankara als CVA 2, die 382. HEV-Passage als CVA 382, die 574. HEV-Passage als MVA 574 und die 486. EMS-Passage als CVA 486 bezeichnet.

In das Genom von MVA 574 und CVA 382 wurde durch Transfektion (siehe Abschnitt 3.3.1) das 5,2 Kbp EcoRI-Fragment der DNA von CVA 2 inseriert. Dieses Fragment überlappt eine für MVA 574 in diesem Bereich beschriebene Deletion und enthält das komplett Vaccinia-virus "host range" Gen (Altenburger, 1989). Die durch Transfektion entstandenen Konstrukte werden im folgenden mit eMVA bzw. eCVA 382 abgeführt.

### 3.3. Markierungs-Kontrolle

#### Material:

Chlormischkloridgradienten gereinigte Plasmid-DNA des Klones pTA 5,2 (enthält das 5,2 Kbp große EcoRI-Fragment von CVA 2); Herstellung und Reinigung siehe Mayer et al., in Vorbereitung).

2 M CaCl<sub>2</sub>; sterilfiltriert

Hepes-Saline-Puffer (HES): 5x Stammlösung: 0,7 M NaCl, 25 mM KCl, 3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM Dextrose, 110 mM Hepes, pH-Wert mit NaOH auf exakt 7,05 eingestellt.

Heringssperma-DNA: 10 mg/ml

Das klonierte 5,2 Kbp EcoRI-Fragment wurde nach dem Prinzip von Graham und van der Eb (1973) als Calcium-Phosphat-Präcipit in die Zellen eingeschleust (Transfektion). Dazu wurden 1 µg pTA 5,2 Plasmid-DNA und 9 µg Heringssperma-DNA in 1 ml HES-Puffer aufgenommen (DNA-Konzentration von 10 µg/ml), tropfenweise 62 µl C2Cs eingespeist und das Gemisch bis zur Bildung eines feinen Niederschlags bei Raumtemperatur 30 Min. inkubiert. Als Negativkontrollen

wurden nach dem gleichen Verfahren nur Heringssperma-DNA bzw. nur Plasmid-DNA ohne Insert präcipitiert.

Als Screening-System für einen funktionierenden host range-Genbereich wählten wir das Wachstum auf der Zelllinie E-DERM. Das Inokulum wurde 45 Min. bei 37 °C adsorbiert und

### 3.4. Viruszonenkonzentration

#### 3.4.1. Ausgangsmaterial

Dicht gewachsene, primäre HEV-Kulturen wurden mit 1-2 PBK pro Zelle der Vaccinia-Stämme CVA 2, CVA 382, MVA 574 und CVA 486, sowie den Konstrukten eMVA und eCVA 382 infiziert. Die Virusernte erfolgte nach 2 bis 4 Tagen bei einem cytopathischen Effekt (CPE) von 90-100 % durch zweimaliges Zentrifugieren, um die größtenteilszellgebundene Vironen freizusetzen. Das Virusmaterial wurde zur Entfernung großer Zelltrümmer niedrigtourig abzentrifugiert, nach Filtration der Infektiosität aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Dieses im folgenden als Ausgangsmaterial bezeichnete Virusmaterial wurde für alle weiteren Versuche eingesetzt.

#### 3.4.2. Bestimmung des Wirtszellspektrums

Die in Abschnitt 3.1. aufgeführten Zelllinien bzw. Zellkulturen wurden in Plastikkulturenlinsenflächen (25 cm<sup>2</sup>, Ps. Becton Dickinson, Franklin, Schleswig) angezüchtet und nach Absaugen des Mediums mit CVA 2, MVA 574 und eMVA Virusausgangsmaterial beimpft. Die Animpfdosierung betrug 0,05 PFU pro Zelle. Das Inokulum wurde 45 Min. bei 37 °C adsorbiert und

-19-

dann abgesaugt. Nach einem Waschschritt (2 ml EMEM) wurden pro Fläschchen 5 ml Medium mit 3 % BME/FBS zugegeben und bei 37 °C bebrütet. Nach 9, 24 und 72 Stunden p.inf. wurde der cytopathische Effekt beurteilt, die entsprechenden Kulturen zweimal gefriergetaut, kurz beschallt und bis zur Titration bei -70 °C gelagert.

#### 3.4.3. Virustitration

Das Virusmaterial wurde auf sekundären HEF-Kulturen in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Fa. Becton Dickinson, Danard, Schweiz) titriert. Dazu wurden in je 8 Wäpfchen der Plastikbodenplatte je 100 µl Virusverdünnung in EMEM (10<sup>-1</sup> - 10<sup>-8</sup>) und 100 µl Zellsuspension (500.000 Zellen/ml) pipettiert. Nach kurzem Schütteln wurden die Platten für 6 Tage bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Endtitration erfolgte anhand des cytopathischen Effektes. Der Titer des Virusmaterials wurde nach Spearman und Kaerber (Lit. in Mayr et al., 1974) als Kulturinfektiöse Dosis 50 pro ml (KID<sub>50</sub>/ml) angegeben.

#### 3.5. Haemagglutination (HA)

Im Haemagglutinationstest wurden CVA 2, CVA 382, MVA 574, CVA 6ns, MVA, SCVA 382 und als Kontrollstamm Vacciniavirus Mistree getestet. Dazu wurde das Ausgangsmaterial auf U-Boden-Mikrotiterplatten (Fa. Greiner, Müllingen) in log-<sub>2</sub>-Schritten in MECI-Phosphatpuffer verdünnt. Pro Verdünnung wurden dann 0,05 ml einer 0,5 %igen Hühnererythrozytenauspension (weiße Leghorn) in MECI-Phosphat-Puffer zugegeben, die Platten anschließend geschüttelt und bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrollen dienten ein HA-positiver Vacciniavirusstamm (Mistree), sowie eine nicht virusinfizierte Zellkultursuspension. Nach ca. 2 Stunden wurde als HA-Titer die höchste Verdünnung gewertet, bei der noch eine vollständige Hämaggglutination auftrat.

#### 3.6. Verhalten in Mäuse

Alle Brutstiere stammten von weiblichen Leghornhennen der gleichen Geflügelfarm. Nach einer 10-tägigen Vorbehrütung bei 37 °C erfolgte die Infektion der Chorioallantoismembran (CAM).

durch Schalenfensterung und Senkung der CAM. Beimpft wurden je 3 Eier mit 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> und 10<sup>4</sup> KID<sub>50</sub> / 0,1 ml. Die Nachbebrütung erfolgte bei 36 °C. Am 4. Tag post inf. wurde der Charakter der Primärherde auf der CAM bestimmt, die Absterbequote ermittelt und die Generalisierungstendenz beurteilt.

#### 3.7. Verhalten in der weiblichen Maus

##### Versuchstiere:

Für die Untersuchungen wurden weibliche Mäuse des Zuchtstamms NORI im Alter von 6 Wochen und 2-3 Tage alte NORI-Babyäuse beiderlei Geschlechts verwendet.

##### Virusmaterial:

Zur Infektion wurde das Ausgangsmaterial der Vacciniavirusstämme CVA 2, MVA 574 und MVA auf einen Titer von 3 x 10<sup>4</sup> KID<sub>50</sub>/ml eingestellt.

##### Versuchsdurchführung:

Die erwachsenen Mäuse wurden mit je 1 ml Virussuspension Intra-peritoneal (i.p.) oder mit je 0,05 ml Virussuspension Intracerebral (i.c.) infiziert. Babyäusen konnten 0,1 ml i.p. bzw 0,02 ml i.c. appliziert werden. Für die Vacciniavirusstämme CVA 2 und MVA 574 wurden für jede Applikationsstufe eine Gruppe von 10 erwachsenen Mäusen und ein Wurf Babyäuse eingesetzt. Mit dem Vacciniaviruskonstrukt MVA wurden jeweils 30 erwachsene Tiere und je 3 Würfe Babyäuse infiziert. Die intracerebrale Applikation erfolgte unter Äthernarkose.

#### 3.8. Fluorcarbon

##### Material:

TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)  
20 %, 40 % und 60 % (w/w) Sucrose in TE-Puffer

Fluorcarbon (Prigen 113 TR-T, Fa. Hoechst, Frankfurt)  
Die Aufräumung von virusinfiziertem Zellkulturmateriel (infiziert mit 5-10 PBK/Selle) erfolgte in Anlehnung an die von Joklik (1962) beschriebene Technik. Dazu wurde das gefriergetrocknete Zellkulturmateriel in einer Kühlzentrifuge (Fa. Measuring and Scientific Equipment Ltd., London) über

-20-

90 Min. bei 21000 g pelletiert, der Oberstand verworfen und das virushaltige Sediment in TB-Puffer aufgenommen. Diese Suspension wurde durch eine fraktionierte Fluorocarbonbehandlung von zellulärem Material gereinigt (Kern, 1987). Präparierte Viruspartikel wurden anschließend in der Ultrazentrifuge (SW 28 Rotor, 25000 Upm., Fa. Beckman, München) durch ein 40 tiges Sucrosekissen (10 ml) pelletiert. Nach Resuspension des virushaltigen Pellets in TB-Puffer erfolgte die weitere Reinigung über einen linearen 20-60 tigen Sucrosegradienten (SW 40 Rotor, 15000 Upm., 90 Min., Fa. Beckman). Das als sichtbare Bande erscheinende Virusmaterial konnte durch Punktentnahmen und nach 4-facher Verdünnung mit TB-Puffer entzuckert werden (SW 40 Rotor, 25000 Upm., 45 Min.).

Alternativ zur Reinigung über Sucrosegradienten wurde das pelzierte Virusmaterial zweimal durch eine 40 tige Sucroseidung (4 ml) zentrifugiert (SW 60 TI Rotor, 25000 Upm., 60 Min., Fa. Beckman). Die Lagerung des in wenig TB-Puffer aufgenommen gereinigten Virusmaterials erfolgte bei -70 °C.

Zur Überprüfung der Reinigungseffizienz wurde das Virusmaterial nach jeder Zentrifugation elektronenoptisch untersucht. Hierzu wurden mit entsprechendem Virusmaterial präparierte Trigemetate nach Negativ-Kontastierung mit 2%iger Phosphorwolframsäure in einem Transmissionselektronenmikroskop (M 10, Fa. Zeiss) kontrolliert.

Der Proteingehalt der gereinigten Virususpensionen wurde in modifizierten Mikro-Lowry-Test (Protein Assay Kit, Fa. Sigma, München) bestimmt.

### 3.2. Nachweis viraler Proteine

#### 3.2.1. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Virusproteine erfolgte durch eine diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli (1970), in einem 12 tigen Acryl-Bisacrylamid-Gel (30:0,8 w/v) unter reduzierenden (durch Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol) Bedingungen. Zur Auf trennung wurden je 10  $\mu$ g gereinigtes Virusmaterial eingesetzt. Die Elektrophoreseszeit betrug 16 Stunden bei 50 V in einer Elektrophoresesapparatur nach Studier (1973). Ein Teil des PAGE-Gels wurde zur Darstellung

der Proteinbanden silbergefärbt (Merril et al. 1981), der ungefärbte Teil des Gels wurde geblottet.

#### 3.9.2. Immunoblot (Western-Blot)

##### Material:

Nitrozellulose, 0,20  $\mu$  m Porengröße (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel)  
HRP Color Development Reagent (Fa. Biotrad, München)

Hyperimmunseren:  
(freundlicherweise von Prof. Dr. H. Mahnert und Dr. C.-P. Cerny zur Verfügung gestellt)

- Anti-MVA Kaninchenserum
- Anti-Elastase Schaf- bzw. Kaninchenserum
- Monoklonaler Maus-Antikörper (MAK) 584

Die Hyperimmunseren wurden in einer Gebrauchsverdünnung 1:100, der MAK 584 1:150 zum Proteinnachweis eingesetzt. Die im PAGE-Gel aufgetrennten Virusproteine wurden in Immunoelektrophoret-Verfahren nach Towbin et al. (1979) auf Nitrozellulose übertragen (Transfer Elektroblotting Kamm, Fa. Pharmacia LKB, Freiburg, 120-180 Min. bei 0,7-0,9 A). Anschließend konnten die immunologisch reaktiven Proteine mit Hyperimmunseren bzw. MAK 584 und nachfolgender Immunfärbung über eine Enzym-Substrat Reaktion nachgewiesen werden.

#### 3.9.3. Reaktion mit Monoklonalem Antikörpern (MAK)

Die Virusstämme CVA 2, CVA 2, MVA 574, MVA und CVA 382 wurden in einem Diagnostik-ELISA zur Differenzierung von Orthopockenviren untersucht (Johann et al., in Vorbereitung). Dieser ELISA differenziert nicht nur die einzelnen Orthopockenvirusarten, sondern unterscheidet auch innerhalb der Species Vaccinia virus. Dabei dienen 9 verschiedene, an die Mikrotitierplatte gebundene MAK als Antigenfänger. Der Nachweis gebundenes Pockenvirusantigens (Ausgangsmaterial) erfolgt über polyklonale Hyperimmunseren mit anti-Spezies Enzykunkonjugaten und Substratreaktion.

#### 3.10. Untersuchung des Virusstocks

##### 3.10.1. Isolierung viraler DNA

##### Material:

Eppendorf Reaktionsgefäß 3810 (1,5 ml), sterilisiert

23-

TEN-Puffer (10xTEN) : 100 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,4, autoclaviert

Proteinase K (Fa. Sigma, München) : 1 mg/ml (w/v) in 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>

SDS, DNase frei (Fa. Sigma, München) : 20 % (w/v)

Phenol, neutralisiert (Herstellung nach Maniatis et al. 1982)

IAC (1 Teil Isooctylalkohol und 24 Teile Chloroform)

3 M Matrriumacetat pH 4,8

Ethanol, absolut bzw. 70 % (bei -20 °C gelagert)

300 µl gereinigte Virususpension wurden mit TEN-Puffer (Endkonzentration 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl), Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) und SDS (Endkonzentration 1 %) versetzt, gemischt und 1 bis 3 Stunden bei 56 °C inkubiert. Durch vorsichtige End-zu-End-Rotation und zweimalige Phenol- und IAC-Extraktion wurde die virale DNA von Proteinresten gereinigt. Die Fällung der freigesetzten DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen Matrriumacetat und doppeltem Volumen absolutem, -20 °C kalten Ethanol's über Nacht (bei -20 °C) oder während 30 Min. (bei -70 °C). Durch eine schminütige Zentrifugation bei 4 °C mit 10 000 UP (Kühlsentrifuge MR 202, Fa. Sigma) wurde die DNA pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem kaltem Ethanol wurde das DNA-Pellet kurz vakuugetrocknet und in wenig TE-Puffer reuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde durch Messung im Photoometer bestimmt (1 OD bei 260 nm = 47,5 µg doppelsträngige DNA/ml) und mit TE-Puffer auf 0,5 µg/ml eingestellt.

### 3.10.2. Gelektrophorese

3.10.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Material:

Horizontal-Submarine-Elektrophorese-Kammer (Fa. Pharmacia LKB, Freiburg)

UV-Transilluminator 302 nm

Sofortbild-Kamera mit Rotfilter und Instant Packfilm Typ 667 oder Typ 665 mit Negativ (Fa. Polaroid, USA)

Electrophoreses-Puffer, 50-fach konzentriert (50xEP) : 2 M Tris, 0,05 M EDTA, 0,25 M Matrriumacetat, pH 7,8

0,5-1,5 % Agarose Seakem (Fa. Biorym, Hørsholm) in 1xEP

Stridiumkond (Fa. Sigma, München) Stammlösung: 10 mg/ml, Gebrauchsdosierung 1:10.000 in 1xEP

Stop-Puffer (10xBSE) : 0,25 % Bromphenolblau, 5 % SDS, 50 % Sucrose, 0,5 M EDTA in Aqu dest.

Restriktionsendonukleasen mit spezifischen React-Pufferlösungen (Fa. Boehringer, Mannheim) : HindIII, Khol, SmaI, EcoRI, ca. 10 units/µl

Die virale DNA wurde nach Herstelleranweisung für 1-3 Stunden bei 37 °C mit dem entsprechenden Enzym inkubiert. Die Zugabe von Stop-Puffer (1/10 Vol.) und Erhitzen auf 65 °C für 10 Min. mit sofortiger Abkühlung auf Eis beendete die Enzymreaktion. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte im Agarosegel bei 2-3 Volt/cm Gel für 20 Stunden. Als Längenstandards dienten KB-Ladder (Fa. BRL, Eggenstein) und mit HindIII geschnittene Lambda-DNA. Zur späteren Auswertung wurde das Gel bei 302 nm UV-Licht fotografiert.

### 3.10.2.2 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Material :

Elektrophoresesapparatur nach Studier (1973)

Elektrophoreses-Puffer: 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3

Die Auftrennung der durch Verdau mit Restriktionsenzymen erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte nach der Methode von Leemmli (1970) in einem 7,5 %igen Acryl-Bisacrylamid-Gel (10:0,8 w/v in Aqu dest.) über Nacht bei 50 Volt. Nach Darstellung der DNA-Banden durch Silberfärbung (Marill et al., 1981) wurde das Gel fotografiert, auf Filterpapier überführt und getrocknet.

### 3.10.3. Bestimmung der Genomfragmente

Die mit Restriktionsenzymen geschnittenen (s. Abschnitt 3.10.2.1.) Virus-DNA wurde durch Zugabe von Formamid (Fa. Pluka, Buchs, Schweiz, bei -20 °C gelagert) in einer Endkonzentration von 60 % (v/v) zum Reaktionsgemisch für 6 min

24-

bei 60 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt (cross link-Präparation). Nur die kovalent gebundenen (cross-linked) Kieselstränge der DNA-Endfragmente lagern sich dabei rasch wieder aneinander ('snap-back'-Mechanismus), während alle anderen Fragmente einsolsträngig bleiben. Dafür können die terminalen Fragmente nach Elektrophorese im Agarosegel dargestellt und im Vergleich mit dem DNA-Bandenmuster des jeweiligen Enzyms identifiziert werden (Machett und Archard, 1979).

#### 3.10.4. Größenbestimmung des Virusgenoms

Zur Erhaltung der Gesamtgenomlänge wurden die Molekulargewichte der durch Restriktionsverdau erhaltenen viralen DNA-Fragmente summiert. Fragmente mit großem Molekulargewicht (> 20 Kbp) wurden aus dem Agarosegel isoliert (s. Abschnitt 3.10.5.4.) und zur genaueren Analyse mit einer zweiten Restriktionsendonuklease nochmals unterverdaut. Mit Hilfe der Molekulargewichtsstandards KB-Ladder und Lambda HindIII konnten dann die Fragmentgrößen durch Addierung der Subfragmente bestimmt werden.

Die genaue Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms zur Sequenzanalyse (Microgenien, Fa. Beckman) auf einem Ton-Digitizer (Fa. Beckman).

#### 3.10.5. Isolierung von DNA-Fragmenten

##### 3.10.5.1 Press Squeeze-Methode

Aus dem Agarosegel herausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden aus Präleistung der DNA zweimal jeweils 30 Min. bei -70 °C / Raumtemperatur gefriergetaut. Nach Kurzem Zentrifugieren durch einen Filter aus silikonisierter Glasvolllese wurde die von Geleisten gereinigte DNA-Lösung mit Phenol und IAC extrahiert. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, pelletiert, vakuumgetrocknet und in 5-10 µl TE-Puffer aufgenommen (vgl. Abschnitt 3.10.1.)

##### 3.10.5.2 DEAE-Membran Technik

##### Material:

DEAE Membran RA-45 (Fa. Schleicher & Schuell, Dassel).

25-

Waschpuffer: 0,15 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 8,0 autoklaviert

Elutionspuffer: 1,0 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 8,0 autoklaviert

Diese Methode wurde nur für Fragmente mit niedrigem Molekulargewicht (<7 Kbp) eingesetzt. Nach Auftrennung der DNA-Banden im Agarosegel wurde unter Sichtkontrolle (UV-Licht, 366 nm) unter- und oberhalb des zu isolierenden DNA-Fragmentes je ein Streifen N-45 Membran in das Gel gesteckt (Winberg und Hammarkjold, 1979). Die Elektrophorese wurde fortgesetzt, bis die DNA-Bande vollständig auf der unteren DEAE-Membran gebunden war (Sichtkontrolle im UV-Licht). Der DEAE-Streifen mit der gebundenen DNA wurde anschließend mit kaltem Waschpuffer von Agaroseresten freigespült und in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit 300 µl Elutionspuffer überführt. Nach 45 Min. Inkubation bei 60 °C im Schüttelvibratordreieck wurde die DNA-haltige Flüssigkeit gewonnen, das Ethidiumbromid mit 3fachem Volumen wassergerüstigtem n-Butanol extrahiert und die DNA mit Ethanol präципitiert (Abschnitt 3.10.1.). Die vakuumgetrockneten Pellets wurden in 5 µl TE-Puffer aufgenommen. So gewonnene DNA konnte zur Markierung durch Nick Translation (Abschnitt 3.11.2.1.) oder Random Oligo Labeling (Abschnitt 3.11.2.2.) eingesetzt werden.

##### 3.10.5.3 Elektrophorese in LMT-Agarose

Diese Methode basiert auf dem von Maniatis et al. (1982) beschriebenen Verfahren.

##### Material :

Low Melting Temperature (LMT)-Agarose (Fa. BRL, Eggenstein)

Virus-DNA in einer Menge von 2-4 µg wurde mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und in einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschte DNA-Bande wurde als Agaroseblockchen herausgeschnitten und in den vorbereiteten Schlitz eines 1% LMT-Agarose-Gels überführt. Der Gelechlitz wurde mit 56 °C warmer Agarose aufgefüllt. Anschließend wurde die Elektrophorese solange fortgesetzt, bis die DNA vollständig in die LMT-Agarose gewandert war. Das DNA-Fragment wurde erneut so genau wie möglich aus dem Gel ausgeschnitten. Pro mg Agarose wurden 3 µl Aquas bidest

suggeben, das Gemisch für 7 Min. bei 100 °C gekocht und dann 10 Min. bei 37 °C equilibriert. Der DNA-Agarose-Mix wurde in Portionen à 20-50 ng DNA aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Nach Bedarf konnten die so gewonnenen DNA-Proben direkt durch Random-Oligo-Labeling (e. Abschnitt 3.11.2.2.) markiert und danach zur Hybridisierung eingesetzt werden.

### 3.10.5.4 Elektrophoretische Elution

#### Material:

LKB 2014 Electrophoretic Concentrator (Fa. LKB Pharmacia, Freiburg)

Die Pufferkammern des Elutionsgerätes wurden mit 1xTBE gefüllt, in die v-förmigen Verbindungskanäle wurde 3 M Matrikumacetat vorsichtig unterrichtet.

Aus einem präparativen Agarosegel wurden die DNA-Fragmente mit einer Mindestmenge von 200 ng DNA als Agaroseblöckchen herausgeschnitten und nach Zerkleinern in die Probenöffnungen der Elutionskammer gegeben. Nach Elektrophorese bei 80 V für 20-60 Min. war die DNA-Probe in die Hochsalzfalle eingeprägt. Das Natriumacetat-DNA-Cästchen, mit einer Kantle entnommen, wurde mit Aqua bidest 1:10 verdünnt und die eluierte DNA mit dem 2,5-fachen Volumen absolutem Ethanol gefällt. Das erhaltene DNA-Pellet wurde zweimal in 70%igem Ethanol gewaschen, vakuumbetrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

Bei dieser Methode wurden DNA-Fragmente mit hohem Molekulargewicht isoliert. Die gewonne DNA konnte mit Restriktionsenzymen nochmals untergeschnitten und im Agarosegel dargestellt werden.

### 3.11. Nachweis viraler DNA

#### 3.11.1. Southern Transfer

Je nach eingesetzter Trägermatrix wurde die Methode nach Southern (1975) in unidirektionalen Blotverfahren oder als Doppel-Sandwich-Blot angewendet.

#### Material:

Mitrocellulosemembran BA 45, 0,45 µm (Fa. Schleicher u. Schuell, Dassel)

Hybond-N+ Transfer Membran (Fa. Amersham, Braunschweig)

1 MW Chr. Hromatographiepapier (Fa. Whatman, Maidstone, GB)

Denaturierungsbuffer 1: 0,25 N HCl

Denaturierungsbuffer 2: 0,5 N NaOH / 0,9 N NaCl

Neutralisierungsbuffer: 1 M Tris-HCl / 0,9 N NaCl, pH 7,4

SSC-Puffer; 20-fach konzentriert (20xSSC): 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat (pH 7,0)

In einem Agarosegel wurden 400 ng mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA / Slot eingesetzt und aufgetrennt. Nach dem Fotografieren wurde das Agarosegel 30 Min. in Aqua dest. entfärbt, die DNA 2x10 Min. in HCl-Puffer und 2x15 Min. in NaOH/NaCl-Puffer denaturiert.

Zum Transfer auf Mitrocellulosefilter wurde das Gel für 60 Min. in Tris-HCl/NaCl neutralisiert, danach 20 Min. in 6 x SSC Aquilibriert und nach der Doppel-Sandwich-Methode abblotet.

Blotaufbau  
(von oben nach unten):

- Glassplatte
- Zellstoffstapel
- 3 Whatman-Filter im Gelgröße
- Mitrocellulosefilter
- Gel
- Mitrocellulosefilter
- 3 Whatman-Filter im Gelgröße
- Zellstoffstapel
- Glassplatte

Zum Transfer auf geladene Trägermembranen (Hybond-N+ Transfer Membran) war eine Neutralisation nicht erforderlich. Als Transferpuffer für den unidirektionalen Kapillarblot diente der verdünnte NaOH-Denaturierungspuffer in einer Endkonzentration von 0,25 N NaOH, 0,9 N NaCl. Die Transferseabren und die Whatmanfilter wurden im Transferpuffer geweicht.

Blotaufbau für den unidirektionalen Kapillarblot  
(von unten nach oben):

- Pufferent mit Transferpuffer
- Glassplatte
- Whatman-Pufferbrücke
- 2 Whatmanfilter im Gelgröße
- Gel
- Transfer-Membran
- 3 Whatmanfilter im Gelgröße
- Zellstoffstapel
- Glassplatte

-28-

-29-

Die Transferdauer betrug beim Doppel-Sandwich-Blot 2-4 Stunden, beim unidirektionalen Kapillarblot 1-16 Stunden. Die DNS wurde anschließend durch 7 Stunden Inkubation bei 80 °C in Vakuumtrockenschrank auf der Trägermembran fixiert.

### 3.11.2. Markierung viraler DNS

#### 3.11.2.1 Markierung durch Nick Translation

Reaktionsprinzip: Ein kontrollierter DNase-Verlust führt zum Kinselstrangbruch ('nick') in der doppelsträngigen DNS.

Durch die Endonuklease-Aktivität der DNS-Polymerase

(Kornberg-Enzym) wird dieser Kinselstrangbruch vergrößert und gleichzeitig durch die Polymerase-Aktivität des Enzyms unter dem Einbau von Biotin-11-UTP wieder verschlossen.

##### Material:

Nick Translation Reagents Kit (Pe. BRL, Eggenstein)

SDS, DNS frei, 5 % (w/v), sterilfiltriert

Sephadex Minigels: Sephadex G50 coarse (Pe. Pharmacia, Franklin) in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit 0,1 % SDS wurde in eine mit silikonisiertem Glasvölle verschlossene 1 ml Einzelaliquotte eingefüllt und exakt 3 Min. bei 300 x g zentrifugiert.

Der Reaktionsansatz erfolgte auf Eis:

x 1 l	DNS-Probe
5 μl	Nukleotid-Lösung (dATP, dCTP, dGTP)
2,5 μl	Biotin-11-UTP
ed 45 μl	A. bidest.
	kurs blischen
5 μl	DNase-Polymerase-Mix
90 min	Inkubation bei 15 °C
5 μl	Stop-Puffer (300 mM EDTA)
1,25 μl	5 % SDS

Zur Reinigung der markierten DNS von freien Nukleotiden wurde der Ansatz auf die Sephadex Minigels aufgetragen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die in einem Eppendorfgefäß aufgefangene markierte DNS konnte nach Denaturierung (10 Min. 95 °C) sofort für Hybridisierungen eingesetzt werden.

#### 3.11.2.2 Markierung durch Oligo Labeling

Reaktionsprinzip: DNS wird durch Einbau von Digoxigenin-dUTP markiert, dabei dienen Oligonukleotide als Startermoleküle für die Synthesereaktion ('random primed'). Diese Methode kann direkt zur Markierung von DNS in LMT-Agarose verwendet werden.

##### Material

DNA Labeling and Detection Kit Monoreactive (Pe. Boehringer, Mannheim)

Stop-Puffer 250 mM EDTA in A. bidest., sterilisiert  
t-RNA (Pe. Boehringer, Mannheim): 0,25 mg/ml in TE-Puffer  
Die DNS-Probe wurde 10 Min. bei 95 °C denaturiert, anschließend sofort auf Eis gestellt. DNS-Proben in LMT-Agarose wurden nach dem Aufkochen 5 Min. bei 37 °C inkubiert und dann kurz gemischt.

Der Reaktionsansatz erfolgte auf Eis, jedoch zur Markierung von DNS in LMT-Agarose bei Raumtemperatur:

x 1 l	DNS-Probe (max. 10 μl)
2 μl	Rezonanzleitid-Gemisch
2 μl	dUTP-Markierungsgemisch (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Dig-dUTP)
ed 10 μl	Aqua bidest.
	kurs blischen

1 μl Klinox Easyline  
1 μl Inkubation für LMT-Proben 12-16 Std. bei RT  
nach unten 60 Min. bei 37 °C  
2 μl Stop-Puffer  
1 μl t-RNA

Durch Zentrifugieren über eine Sephadex G50 Minigel

#### 3.11.3. Hybridisierung

##### 3.11.3.1 Verwendung blotinmarkierter DNS-Proben

##### Material:

Formamid (Pe. Fluka, Buchs, CH), bei -20 °C gelagert  
Denhardt's Lösung, 50-fach konzentriert: 1 % Ficoll,  
1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % BSA (w/v) in A. dest., bei  
-20 °C gelagert  
Pipes, 0,5 M in A. dest., sterilfiltriert